УДК 578.833.28:578.427(571.1)

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В КЛЕЩАХ IXODES PERSULCATUS В СЕВЕРО-ВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

© Т. П. Мнкрюкова,[1] Е. В. Чаусов,[1] С. Н. Коновалова,[1]
Ю. В. Кононова,[1] Е. В. Протопопова,[1] М. Ю. Карташов,[1]
В. А. Терновой,[1] Л. И. Глушкова,[2] И. В. Корабельнников,[3]
Ю. И. Егорова,[3] В. Б. Локтев[1, 4]

[1] Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., 630559
E-mail: loktev@vector.nsc.ru
[2] Управление Роспотребнадзора по Республике Коми
ул. Орджоникидзе, 71, Сыктывкар, 167610
[3] ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора
ул. Димитрова, 3/3, Сыктывкар, 167000
[4] Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090

Поступила 29.01.2014

Проведено определение генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в клещах *Ixodes persulcatus*, собранных на территории Республики Коми в 2010 г. Генотипирование 16 вариантов ВКЭ в гомогенатах таежного клеща на основе анализа нуклеотидной последовательности 5′-нетраслируемой области (5′-НТО) ВКЭ показало, что 3 варианта могут быть отнесены к сибирскому генотипу ВКЭ, а остальные 13 вариантов ВКЭ представлены дальневосточным генотипом ВКЭ. Нуклеотидная последовательность 5′-НТО генома ВКЭ оказалась весьма изменчива. Вариабельность для элемента A1 5′-НТО наблюдалась во всех исследованных образцах, а для элементов C1, B2, CS B — в более чем 50 %. При этом некоторые элементы 5′-НТО оставались полностью консервативными. Компьютерное моделирование конформации района 5′-НТО генома ВКЭ показало возможность изменения пространственной структуры этого района вирусной РНК в клещах *I. persulcatus*. Полученные данные подтверждают гипотезу, что вариабельность 5′-НТО генома ВКЭ может иметь принципиальное значение для обеспечения эффективной репликации ВКЭ в организме хозяина.

Ключевые слова: иксодовые клещи, *Ixodes persulcatus*, вирус клещевого энцефалита, флавивирусы, генетическая изменчивость, филогенетический анализ, нуклеотидная последовательность, 5′-нетранслируемая область генома.

Флавивирусы способны инфицировать широкий круг организмов, которые включают в себя различные виды млекопитающих, насекомых, птиц, рептилий и формируют природные очаги в различных географических регионах мира (Grard et al., 2007). Многие из них вызывают заболевания у человека. Наиболее значимые флавивирусные инфекции связаны с вирусами денге, желтой лихорадки, японского энцефалита, Западного Нила и клещевого энцефалита. Для клинической картины этих заболеваний характерно развитие лихорадки, в том числе с выраженными геморрагическими проявлениями, менингитов и энцефалитов, возникновение тяжелых поражений печени и других внутренних органов. Для России наибольшее медицинское значение имеет вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) (Korenberg, Kovalevskii, 1999). ВКЭ был открыт в 1937 г. на Дальнем Востоке (Зильбер, 1939) как возбудитель клещевого энцефалита. ВКЭ принадлежит к группе вирусов одноименного комплекса и вызывает у людей заболевание центральной нервной системы с уровнем смертности 1—2 % для европейского и сибирского генотипов и до 30 % — для дальневосточного генотипа (Gritsun et al., 2003).

В большинстве случаев передача флавивирусной инфекции осуществляется членистоногим переносчиком — через укус комара или клеща. Флавивирусы, переносимые клещами, подразделяются на 2 основные группы по их основному хозяину — грызунам и морским птицам. Флавивирусы, связанные с морскими птицами, широко распространены в районах массового гнездования морских птиц в Северном и Южном полушарии (Chastel et al., 1985). Это позволило высказать гипотезу, что эти флавивирусы распространились из районов обитания птиц, достигали лесов Евразии, где их циркуляцию стали поддерживать иксодовые клещи и грызуны (Gao et al., 1993; Zanotto et al., 1995; Gould et al., 1997).

Наиболее распространенная гипотеза эволюции флавивирусов состоит в том, что они является потомками вирусов, существовавших около 10—13 тыс. лет назад в конце последнего ледникового периода (Zanotto et al., 1996). Именно его окончание изменило климатические условия и географическое распространение многих видов насекомых, птиц и млекопитающих. Это изменило географию распространения флавивирусов, создало условия для их эволюции в новых природных условиях, а также предопределило формирование 3 основных современных генотипов ВКЭ: европейского, сибирского и дальневосточного (Субботина, Локтев, 2012). Представители всех 3 генотипов ВКЭ активно циркулируют в различных регионах России. Внутривидовые различия для ВКЭ по аминокислотной последовательности составляют 1.6—9.0 %, а по нуклеотидной последовательности они могут достигать 4.8—17.3 % (Локтев, 2011). На территории Сибири и Дальнего Востока встречаются представители дальневосточного и сибирского генотипов. Европейский генотип, как правило, обнаруживается лишь на европейской части российской территории. Принципиальным переносчиком для европейского генотипа ВКЭ является клещ *Ixodes ricinus* Linnaeus, 1758, а сибирский и дальневосточный генотипы ВКЭ ассоциируются с клещом *Ixodes persulcatus* P. Sch., 1930.

Расчет времени дивергенции основных генотипов ВКЭ показал, что европейский генотип ВКЭ отделился от общего предка для современных вариантов ВКЭ около 2750 (2416—3179) лет назад (Субботина, Локтев, 2012). По всей вероятности, с тех пор европейский генотип эволюционировал независимо от других генотипов ВКЭ. Дивергенция сибирского и дальневосточного генотипов произошла примерно 2250 (1944—2628) лет назад, что позволяет предположить их более молодое эволюционное происхождение. Ранее также были получены сходные значения времени дивергенции для основных генотипов ВКЭ, которые колебались в пределах от 1700 до 2800 лет (Suzuki, 2007).

Возможным фактором изменения природной среды явилось бурное развитие человеческой цивилизации, что также создало предпосылки ускоренной эволюции флавивирусов, особенно в течение последних 2—3 веков. Это могло предопределить формирование новых генотипов ВКЭ. Одна из гипотез географического распространения ВКЭ утверждает, что ВКЭ распространялся в западном направлении по евразийскому континенту (Zanotto et al., 1995). Существует также предположение о том, что дальневосточный генотип постепенно вытесняет другие генотипы на территории России, распространяясь вдоль транспортных путей по оси «восток—запад» (Kovalev et al., 2010). На наш взгляд, представляется более вероятным распространение предшественников современных вариантов ВКЭ по оси «юг—север». Проведенная недавно оценка возможности изменения северной границы ареала *Ixodes scapularis* Say, 1821 на территории Канады показала, что граница распространения клещей может изменяться в пределах 200—1000 км по оси «юг—север» в зависимости от изменения средней температуры всего на несколько градусов (Ogden et al., 2006). Такое изменение ареала иксодовых клещей, являющихся основным резервуаром для клещевых флавивирусов, позволяет высказать предположение, что генетическое разнообразие ВКЭ также может быть весьма тесно связано с изменением географического ареала иксодовых клещей по оси «юг—север», а в рамках гипотезы глобального потепления можно предполагать возможность существенных изменений распространения клещевых инфекционных заболеваний.

В последние годы наблюдается очень существенный рост, более чем в 50 раз, заболеваемости клещевым энцефалитом в северных регионах европейской части страны. Он сопровождается распространением таежного клеща в этом регионе России (Глушкова и др., 2011; Tokarevich et al., 2011; Глушкова и др., 2012а, б; Revich et al., 2012). Это согласуется с вышеупомянутой гипотезой изменения ареала иксодовых клещей по оси «север—юг» и появлением клещевых инфекций в новых географических районах. Представляется, что исследование особенностей молекулярной эпидемиологии ВКЭ в природных биотопах различных районов России, в том числе и в северных регионах Евразии, может дать новую информацию о реальной ситуации с распространением ВКЭ и о его генетическом разнообразии.

Цель данной работы состояла в проведении генотипирования современных вариантов ВКЭ и оценки возможной вариабельности генома ВКЭ в таежных клещах на северо-востоке европейской части России. Для этого были определены нуклеотидные последовательности 5′-НТО фрагментов генома ВКЭ из индивидуальных клещей. Данный район вирусного генома был выбран на основании ранее полученных данных о возможности его использования для генотипирования ВКЭ и его изменчивости в клещах

I. persulcatus и *I. pavlovskyi* Pom., 1946 (Chausov et al., 2010). Принято считать, что 5′-НТО генома флавивирусов формируют так называемую Y-структуру, представленную в виде шпилечной структуры РНК, и, которая в комплексе с 3′-НТО, по всей вероятности, определяет особенности репликации флавивирусов в чувствительных клетках (Mandl et al., 1993; Khromykh et al., 2001). Основные элементы 5′-НТО обозначены на рис. 1 и в таблице. Элементы этого района вирусного генома обеспечивают связывание с вирусной РНК зависимой РНК полимеразой, связывание с рибосомами клетки, а также в этой районе расположен ATG кодон. Совокупность этих данных позволяла предположить, что изменчивость этого района вирусного генома может играть важную роль в адаптации вируса к репликации в клетках клеща и млекопитающих.

Прямое определение нуклеотидной последовательности 5′-НТО генома ВКЭ из таежного клеща позволило провести генотипирование ВКЭ в индивидуальной особи таежного клеща. Это дало возможность описать генетическую вариабельность ВКЭ и провести анализ возможных изменений пространственной структуры 5′-НТО вирусной РНК, выделенной непосредственно из таежных клещей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследованные образцы. В исследование были взяты иксодовые клещи *Ixodes persulcatus*, собранные в южных и центральных районах Республики Коми в 2010 г. по методике, описанной в работе (Глушкова и др., 2012а, б). Отлов клещей в Республике Коми проведен сотрудниками ФГУП «Дезинфекция», г. Сыктывкар Роспотребнадзора методом сбора «на флаг». Для проведения исследований за весенне-летний период 2010 г. было собрано 1137 клещей в южных и центральных районах республики, где наиболее часто регистрировалось нападение клеща на человека. Все собранные клещи представлены имаго одного вида — *I. persulcatus*. Соотношение самцов и самок было примерно одинаковым (самцы — 49.5 %, самки — 50.5 %). Участки для сбора подбирали в типичных местах обитания клещей: лиственные и смешанные леса с хорошо развитым травянистым покровом, вырубки с естественным возобновлением лиственных пород, луга, обочины дорог. Периодичность сбора на флаг для оценки численности клещей составляла 7—14 дней. Собранных клещей помещали в индивидуальные пластиковые пробирки и хранили в морозильной камере при температуре минус 18—24 °C.

Пробоподготовка и выделение РНК, ДНК. Гомогенизацию образцов осуществляли растиранием в ступке с 300 мкл фосфатно-солевого буфера. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл гомогената с использованием наборов «РИБО-сорб» («Интерлабсервис», Россия), согласно инструкции производителя. Обратная транскрипция. Синтез кДНК проводили с использованием набора «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия), согласно инструкции производителя. ПЦР осуществляли в 30 мкл смеси с помощью Taq-ДНК-полимеразы («Медиген», Россия) в прилагаемом буфере. Для выявления РНК вируса клещевого энцефалита использовали олигонуклеотидные праймеры, описанные в (Chausov et al., 2010).

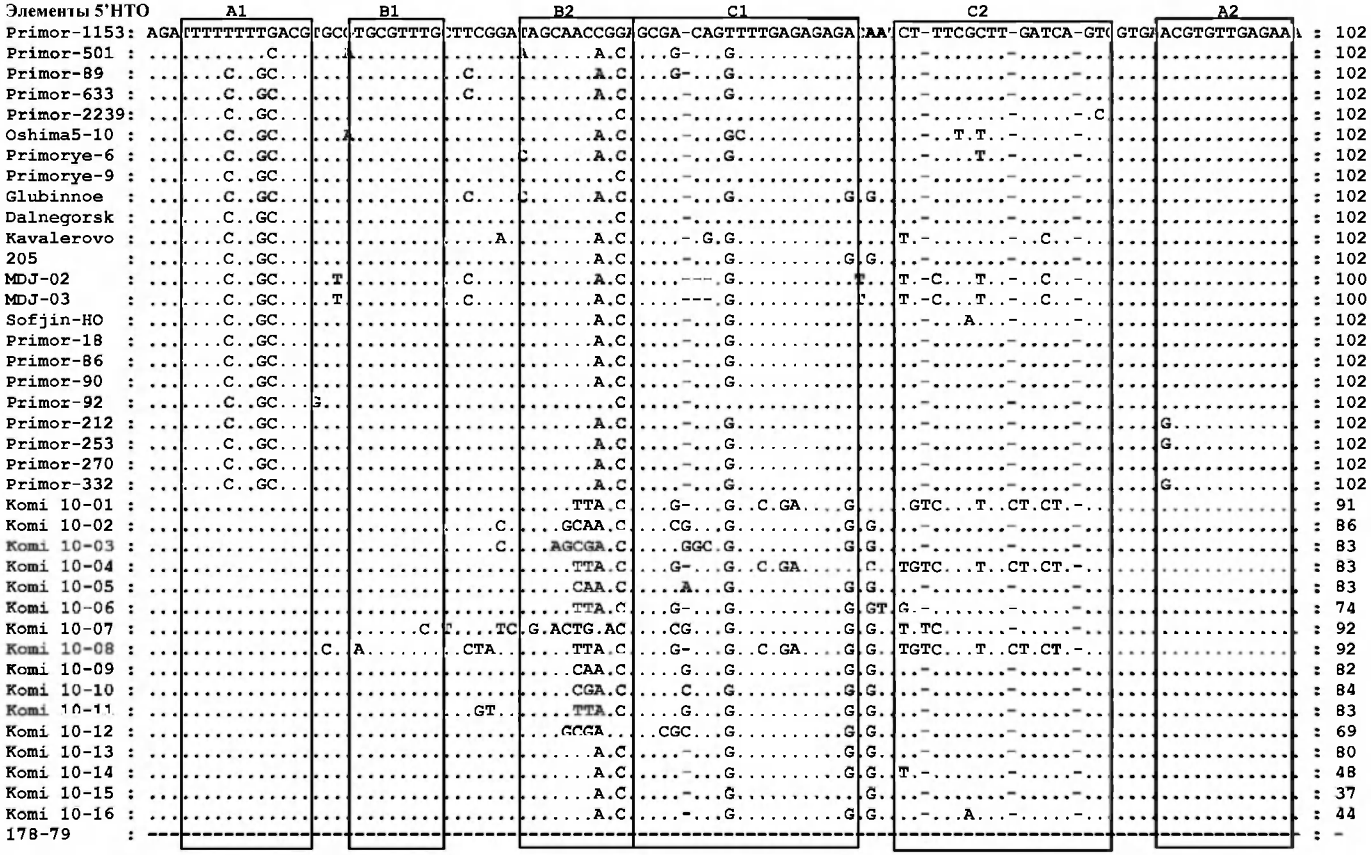
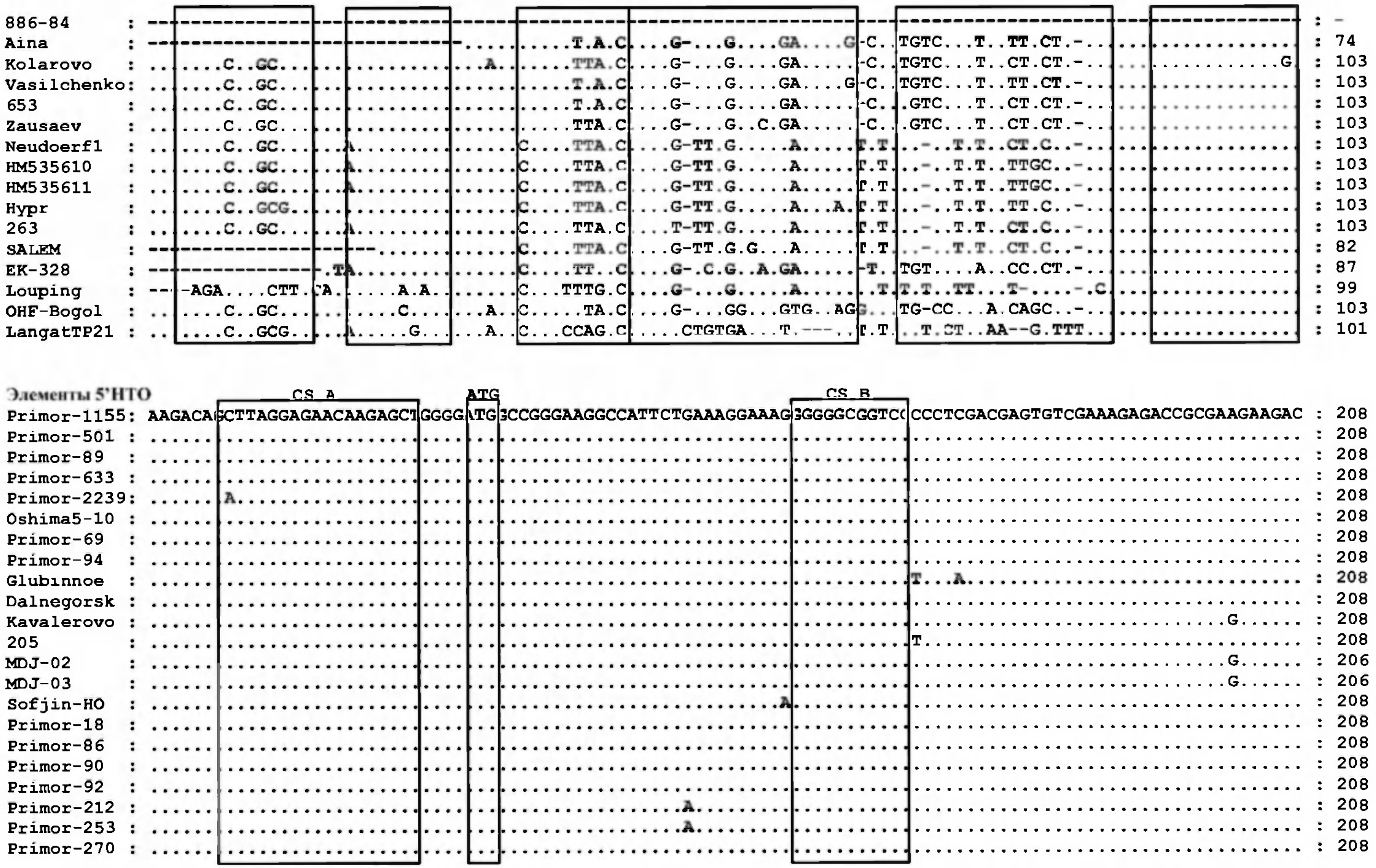


Рис. 1. Выравнивание нуклеотидной структуры 5′-НТО изолятов ВКЭ, выделенных из индивидуальных иксодовых клещей, отловленных в Республике Коми, с известными нуклеотидными последовательностями штаммов ВКЭ.

Рамками выделены известные структурные элементы 5′-НТО (Mandl et al., 1993; Khromykh et al., 2001).

Fig. 1. Alignment of 5′-NCR region sequence of TBEV from individual Taiga ticks collected in the Komi Republic with well-known nucleotide sequences for prototype strains of TBEV.

The structural elements of 5′-NCR are marked by boxes. (Mandl et al., 1993; Khromykh et al., 2001).



```
886-84      : ---------------------------------------------------------------------------------------------------------- : -
Aina        : -----------------------------..........T.A.C....G-...G....GA....G-C..TGTC...T..TT.CT.-.................... : 74
Kolarovo    : .......C..GC...................A.......TTA.C....G-...G....GA.....-C..TGTC...T..CT.CT.-...................G : 103
Vasilchenko: .......C..GC...........................T.A.C....G-...G....GA....G-C..TGTC...T..TT.CT.-.................... : 103
653         : .......C..GC...........................T.A.C....G-...G....GA.....-C...GTC...T..CT.CT.-.................... : 103
Zausaev     : .......C..GC...........................TTA.C....G-...G..C.GA.....-C...GTC...T..CT.CT.-.................... : 103
Neudoerf1   : .......C..GC......A...............C....TTA.C....G-TT.G.....A.....T.T...-..T.T..CT.C..-.................... : 103
HM535610    : .......C..GC......A...............C....TTA.C....G-TT.G.....A.....T.T...-..T.T..TTGC..-.................... : 103
HM535611    : .......C..GC......A...............C....TTA.C....G-TT.G.....A.....T.T...-..T.T..TTGC..-.................... : 103
Hypr        : .......C..GCG.....................C....TTA.C....G-TT.G.....A...A.T.T...-..T.T..TT.C..-.................... : 103
263         : .......C..GC......A...............C....TTA.C....T-TT.G.....A.....T.T...-..T.T..CT.C..-.................... : 103
SALEM       : ---------------------.............C....TTA.C....G-TT.G.G...A.....T.T...-..T.T..CT.C..-.................... : 82
EK-328      : ----------------.TA...............C....TT..C....G-.C.G..A.GA.....-T..TGT....A..CC.CT.-.................... : 87
Louping     : ----AGA....CTT.CA......A.A........C...TTTG.C....G-...G.....A.......T.T.T..TT...T-....-.C.................. : 99
OHF-Bogol   : .......C..GC...........C.......A..C.....TA.C....G-...GG...GTG..AGG...TG-CC...A.CAGC..-.................... : 103
LangatTP21  : .......C..GCG.....A.....G......A..C...CCAG.C.....CTGTGA...T.---..T.T...T.CT..AA--G.TTT.................... : 101

Элементы 5'НТО       CS_A             ATG                             CS_B
Primor-1155: AAGACAGCTTAGGAGAACAAGAGCTGGGGATGGCCGGGAAGGCCATTCTGAAAGGAAAGGGGGCGGTCCCCCTCGACGAGTGTCGAAAGAGACCGCGAAGAAGAC : 208
Primor-501  : ......................................................................................................... : 208
Primor-89   : ......................................................................................................... : 208
Primor-633  : ......................................................................................................... : 208
Primor-2239: .......A................................................................................................. : 208
Oshima5-10  : ......................................................................................................... : 208
Primor-69   : ......................................................................................................... : 208
Primor-94   : ......................................................................................................... : 208
Glubinnoe   : ......................................................................T...A.............................. : 208
Dalnegorsk  : ......................................................................................................... : 208
Kavalerovo  : ..................................................................................................G...... : 208
205         : ......................................................................T.................................. : 208
MDJ-02      : ..................................................................................................G...... : 206
MDJ-03      : ..................................................................................................G...... : 206
Sofjin-HO   : ..........................................................A.............................................. : 208
Primor-18   : ......................................................................................................... : 208
Primor-86   : ......................................................................................................... : 208
Primor-90   : ......................................................................................................... : 208
Primor-92   : ......................................................................................................... : 208
Primor-212  : .................................................A....................................................... : 208
Primor-253  : .................................................A....................................................... : 208
Primor-270  : ......................................................................................................... : 208
```

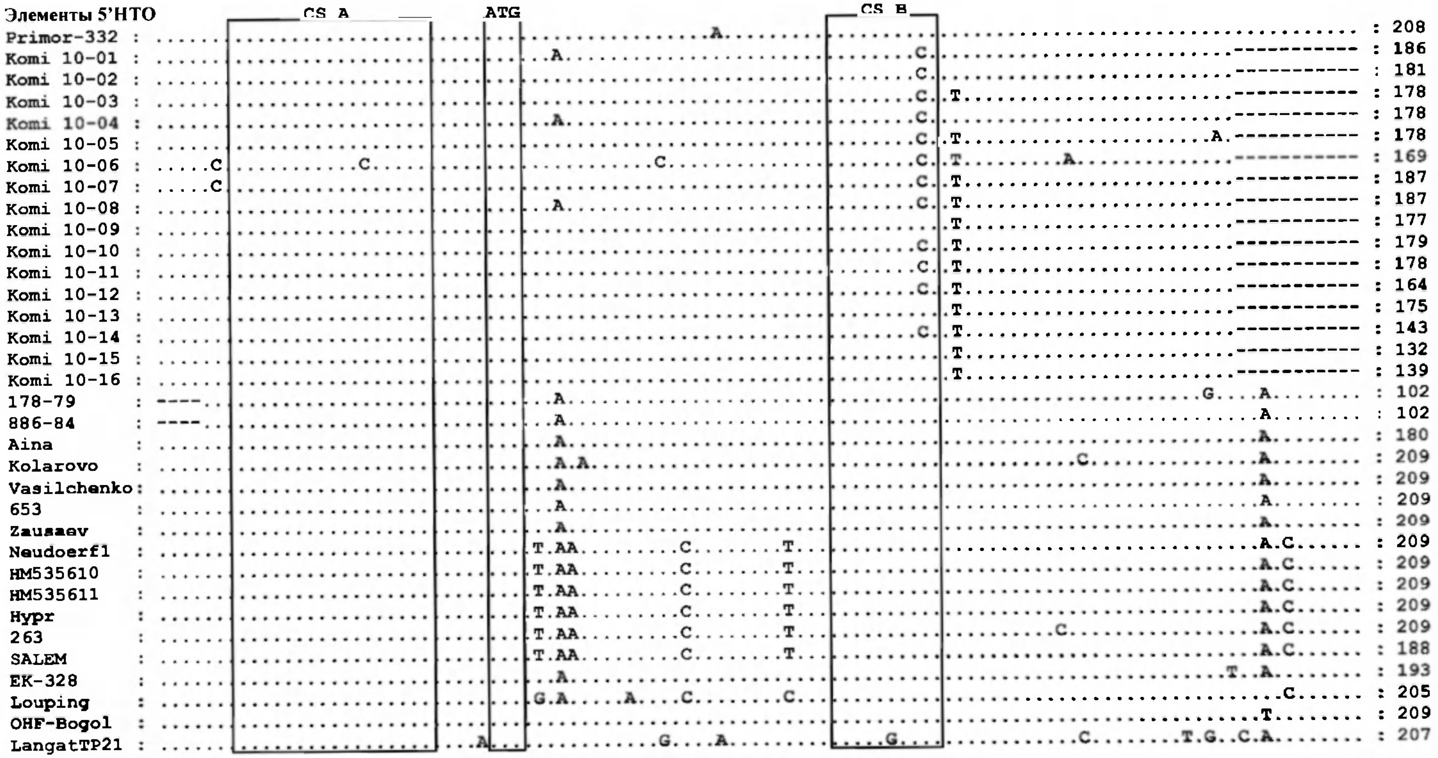


Рис. 1 (*продолжение*).

Вариабельность элементов 5′-НТО ВКЭ в нксодовых клещах,
собранных в Республике Коми

Variability of 5′-NCR elements of the TBEV in Taiga ticks collected in Komi Republic

Элементы 5′-НТО	Доля последовательностей с нуклеотидными заменами, %	Число последовательностей дальневосточного/ сибирского генотипов
A2	100	13/3
A2	0	0/0
B1	12.5	1/1
B2	56.25	9/0
C1	81.25	10/3
C2	37.5	4/2
Сайт вирусной РНК-полимеразы	31.25	4/1
CS A	6.25	1/0
CS B	75	9/3
ATG	0	0/0

Примечание. Наличие замен вычисляли относительно штамма 205 (GeneBank номер DQ989336) для дальневосточных вариантов ВКЭ и штамма Заусаев (AF527415) для сибирских вариантов ВКЭ.

Температурные параметры ПЦР: (Eppendorf Mastercycler Gradient, Германия): 94 °C — 10 с, 60 °C — 20 с, 72 °C — 30 с (40 циклов), 72 °C — 7 мин.

Электрофоретический анализ и выделение ампликонов из геля. Продукты амплификации анализировали в 2 %-ном агарозном геле в однократном буфере ТАЕ (40 мМ Трис, 1 мМ Na_2ЭДТА, уксусная кислота). Для выделения продуктов амплификации из агарозного геля использовали набор Wizard SV Gel и PCR Clean-Up System (Promega, США).

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК. Определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации проводили с использованием автоматического секвенатора ABI 3130XL (Applied Biosystems, США) и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Определение нуклеотидной последовательности проводили не менее 2 раз в независимых экспериментах.

Нуклеотидные последовательности. Нуклеотидные последовательности для сравнения были взяты из базы данных GeneBank. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи приложения AlignX программного пакета Vector NTI 10 (InforMax, США). Филогенетический анализ последовательностей штаммов и изолятов ВКЭ проводили при помощи программы Mega 5 (Tamura et al., 2011). Анализ вторичной структуры 5′-НТО проводили с использованием программы MFold v.3.2 (Zuker, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенного исследования было установлено, что вирусофорность собранных таежных клещей различалась в разные месяцы эпидсезона. Так, положительными на наличие РНК ВКЭ в окрестностях г. Сыктывкара в конце мая оказались 16 из 59 особей клещей, в начале июня из 119 особей только в 2 была обнаружена РНК ВКЭ. Усредненный уровень вирусофорности составил 4.7 % для пригородных районов г. Сыктывкара. Гомогенаты ПЦР-положительных индивидуальных клещей были использованы для определения нуклеотидной последовательности фрагмента 5′-нетраслируемой области генома (5′-НТО), как описано нами ранее (Chausov et al., 2010). Данный подход позволил избежать культивирования ВКЭ в лабораторных условиях с риском адаптации вирусного изолята к лабораторным системам культивирования и возможной потери (изменения) вирусного изолята при этом. Определена последовательность 5′-НТО с фрагментом капсидного белка ВКЭ для 16 ПЦР-положительных образцов, что составило приблизительно треть от всех ПЦР-положительных образцов. По всей вероятности, в остальных образцах концентрация вирусной РНК оказалась недостаточной для проведения прямого секвенирования.

На рис. 1 представлено выравнивание 16 нуклеотидных последовательностей 5′-НТО ВКЭ в сравнении с уже известными последовательностями этого района вирусного генома. Нуклеотидная последовательность 5′-НТО вирусного генома позволяет провести генотипирование штаммов и изолятов ВКЭ (Chausov et al., 2010). Среди исследованных изолятов ВКЭ филогенетический анализ выявил сибирский и дальневосточный генотипы ВКЭ (рис. 2). Интересно, что изолятов, относящихся к европейскому генотипу ВКЭ, не было обнаружено. Большинство исследованных последовательностей оказалось оригинальным: они не имели 100 % сходства с известными прототипами среди сибирских и дальневосточных вариантов ВКЭ. Тринадцать образцов (81.5 %) принадлежат к дальневосточному генотипу и распадаются на несколько групп близких к штаммам Primorye-91, 205 и Glubinnoe-2004. Наиболее генетически разнообразным оказался кластер штамма 205, который имеет тенденцию к дивергенции на 3 субгруппы.

Варианты Komi 10—01, Komi 10—04 и Komi 10—08 (18.5 % образцов) группировались с известными геновариантами сибирского генотипа ВКЭ, но не были полностью им идентичны. Это, прежде всего, штамм Заусаев ВКЭ, который способен вызывать развитие хронического клещевого энцефалита у человека (Gritsun et al., 2003a).

Совершенно неожиданно то, что нам не удалось обнаружить штаммы европейского генотипа ВКЭ, а доля сибирского генотипа при этом, как оказалось, является минорной. Выраженное доминирование дальневосточного генотипа ВКЭ в иксодовых клещах, собранных в летний сезон 2010 г., свидетельствует в пользу того, что дальневосточный генотип достаточно широко распространен на северо-востоке европейской части России. Разнообразие его геновариантов в таежном клеще показывает, что ВКЭ длительный период времени эволюционировал в исследованных биотопах Республики Коми и, по всей вероятности, здесь сформировались природные очаги ВКЭ с доминированием дальневосточного генотипа ВКЭ.

5′-НТО лабораторных штаммов флавивирусов, адаптированых к культивированию на клетках млекопитающих, достаточно консервативна (Schrader, Süss, 1999). Однако недавно было обнаружено, что степень вариабельности 5′-НТО может достигать 55 % для европейского генотипа

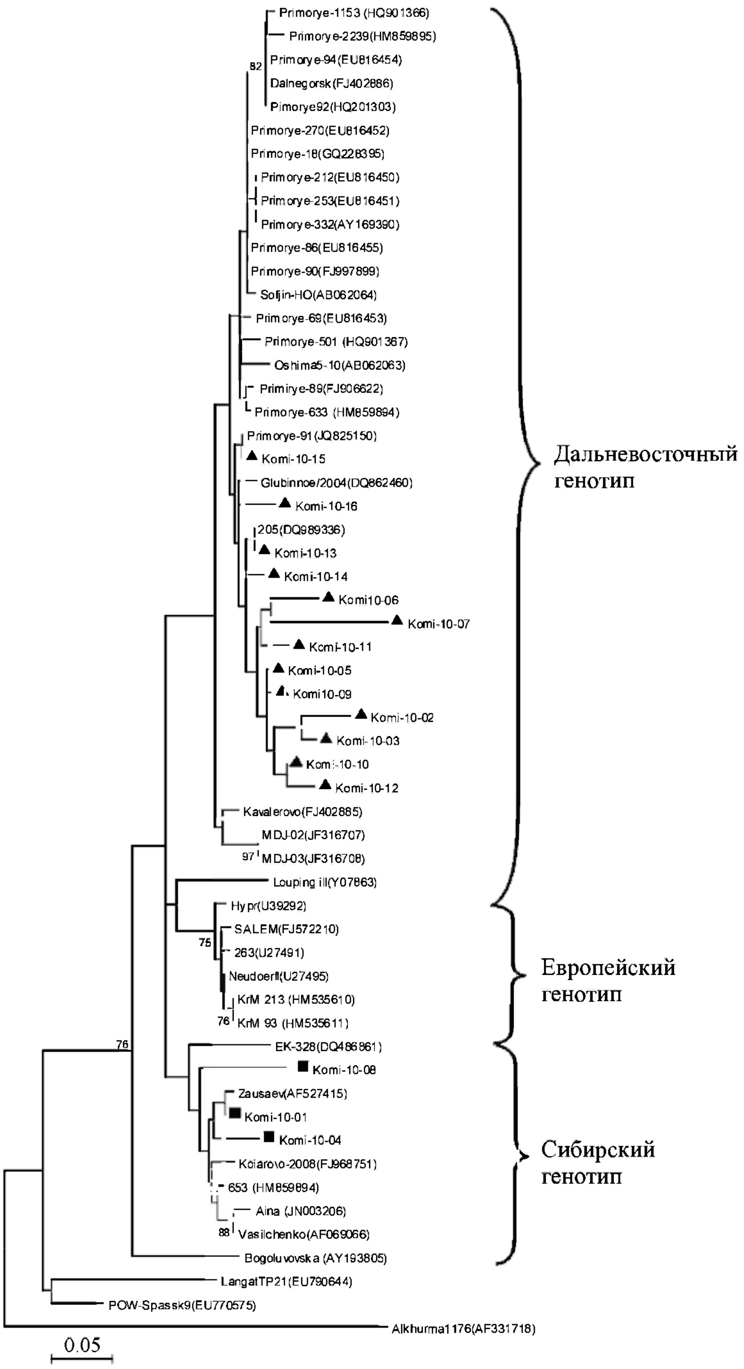


Рис. 2. Филогенетическое дерево изолятов вируса клещевого энцефалита, построенное на основе нуклеотидных последовательностей 5′-НТО методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-параметрической модели Кимуры.

Изоляты ВКЭ из иксодовых клещей, отловленных в Республике Коми, обозначены «Komi». Прототипные штаммы ВКЭ приведены в оригинальной транскрипции GeneBank.

Fig. 2. Phylogenetic tree (neighbour-joining, Kimura two-parameter distances) for tick-borne encephalitis virus (TBEV) was constructed with using 5′-NCR fragments of viral genome.

Isolates TBEV from ixodid ticks are marked as «Komi». The prototype strains of TBEV are presented in the original abbreviations from GeneBank.

ВКЭ в клещах *I. ricinus* (Casati et al., 2006). Было высказано предположение о том, что вариабельность 5′-НТО обеспечивает микроэволюцию ВКЭ в иксодовых клещах и адаптацию ВКЭ к репликации в клетках различных видов переносчиков и резервуарных хозяев в природных очагах.

Анализ последовательности 5′-НТО РНК ВКЭ в собранных таежных клещах показал, что этот район вирусного генома вариабелен. В таблице приведены сводные данные по количеству замен в индивидуальных последовательностях ВКЭ. Полученные данные подтверждают существенную вариабельность этого района генома ВКЭ в индивидуальных клещах. Уровень вариабельности для некоторых элементов Y-структуры 5′-НТО обнаруживался в 100 % образцов, а для элементов A1, C1, B2, CS B превышал 50 % и колебался от 56.25 до 100 %. Однако при этом элементы A2 и ATG кодон в 5′-НТО были полностью консервативны.

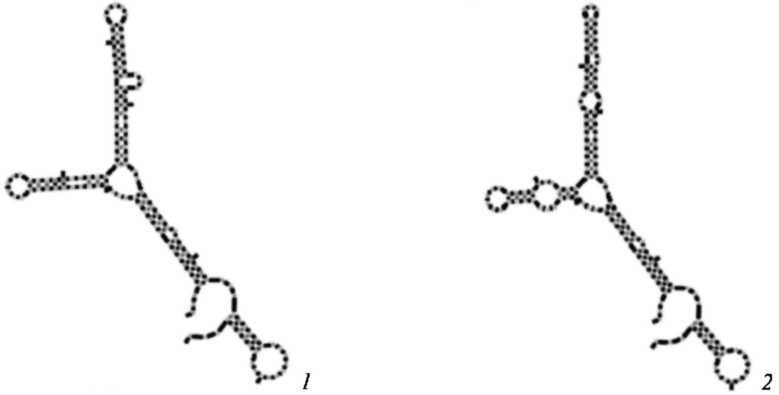
Для уточнения возможного влияния наблюдаемых нуклеотидных замен на конформацию района 5′-НТО генома исследованных вариантов ВКЭ было проведено компьютерное моделирование вторичной структуры РНК (рис. 3). Полученные результаты показывают, что 5′-НТО вирусной РНК могут иметь существенные изменения пространственной структуры этого района вирусного генома. Исключение составили только варианты Komi 10—13 и Komi 10—15, имеющие вторичную структуру 5′-НТО, характерную для адаптированных к клеткам млекопитающих вариантов дальневосточного генотипа ВКЭ, и вариант Komi 10—01, обладающий структурой 5′-НТО, характерной для сибирского генотипа ВКЭ. Остальные 13 последовательностей имели структуру 5′-НТО, отличную от известных лабораторных штаммов ВКЭ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основным переносчиком ВКЭ являются клещи *I. persulcatus* и *I. ricinus* (Gritsun et al., 2003). Вирусы клещевого энцефалита широко распространены в северной части Евро-Азиатского континента, где ежегодно регистрируется до 14 000 случаев заболевания. Заболеваемость клещевым энцефалитом регистрируется более чем в 25 европейских и 7 азиатских странах (Charrel et al., 2004). К настоящему времени известны 3 субтипа ВКЭ: дальневосточный, сибирский и западноевропейский (Ecker et al., 1999). Среди этих трех субтипов географически наиболее широко распространен сибирский генотип, который доминирует в Сибири, в Центральной Азии и на Урале (Злобин и др., 2007; Локтев и др., 2007).

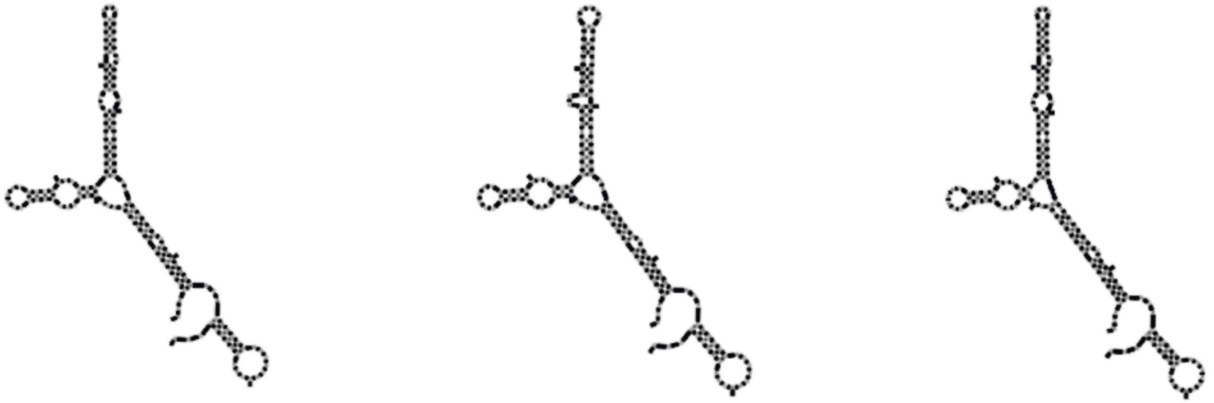
Современные границы ареала таежного клеща простираются в направлении с востока на запад полосой в пределах зоны таежных лесов на территории севера Евразии. На территории Республики Коми точные границы распространения *I. persulcatus* четко не определены, однако известно, что в последние десятилетия произошло резкое продвижение границы на север. Ретроспективная оценка данных энтомологического мониторинга позволяет отметить, что в 1960-х годах *I. persulcatus* встречался лишь в южных районах республики (59—62° с. ш.). В последнее десятилетие энтомологи отмечают активное распространение *I. persulcatus* в центральных административных территориях, расположенных до 63° с. ш. в сред-

Вторичная структура 5'-НТО генома ВКЭ, адаптированных к культуре клеток млекопитающих.



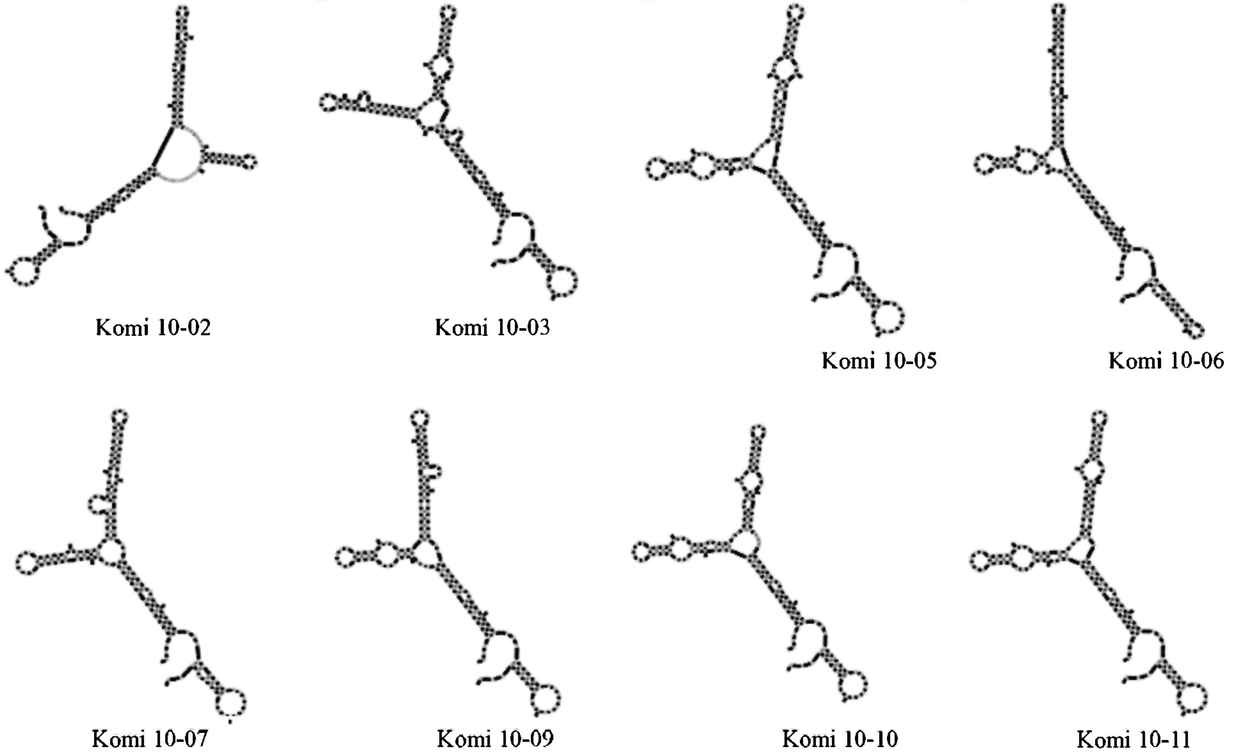
1 – дальневосточный генотип ВКЭ,
2 – сибирский и европейский генотипы ВКЭ.

Сибирский генотип ВКЭ, структура 5'-НТО генома ВКЭ в таежном клеще.



Komi 10-01 Komi 10-04 Komi 10-08

Дальневосточный генотип ВКЭ, структура 5'-НТО генома ВКЭ в таежном клеще.

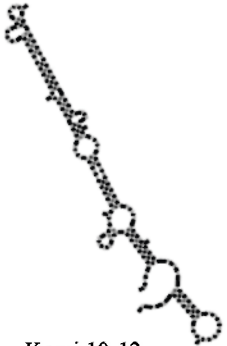


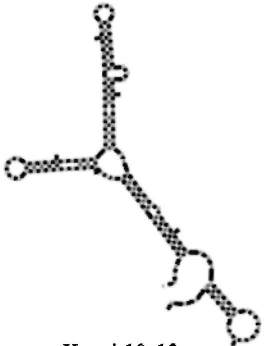
Komi 10-02 Komi 10-03 Komi 10-05 Komi 10-06

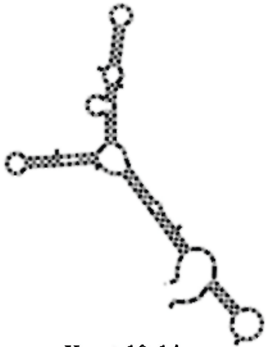
Komi 10-07 Komi 10-09 Komi 10-10 Komi 10-11

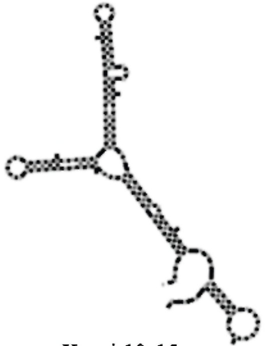
Рис. 3. Предполагаемая вторичная структура 5′-НТО геномной РНК ВКЭ, изолированной из таежных клещей, отловленных в Республике Коми.

Fig. 3. Putative secondary structure for 5′-NCR genomic RNA of TBEV. Viral RNA was isolated from Taiga ticks collected in Komi Republic.


Komi 10-12


Komi 10-13


Komi 10-14


Komi 10-15

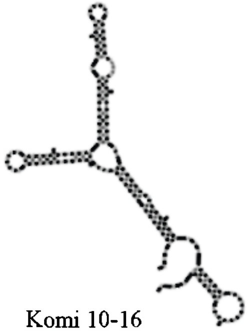

Komi 10-16

Рис. 3 (*продолжение*).

не- и северо-таежных подзонах (Глушкова и др., 2011). В настоящее время укусы людей нксодовыми клещами регистрируются до 63° с. ш. в районе г. Ухты. В течение последних трех лет наблюдения отмечается устойчивый рост заболеваемости КЭ, которая повысилась приблизительно в 8 раз и превышает российские показатели (Глушкова и др., 2012а, б). Однако отсутствуют какие-либо данные по генетическому разнообразию ВКЭ и представленности различных генотипов ВКЭ в таежном клеще в этом регионе России.

Мы определили нуклеотидные последовательности 5′-НТО и фрагмента N-конца белка С для 16 вариантов ВКЭ от таежных клещей, собранных в Республике Коми (Северо-Восток европейской части РФ) в течение 2010 г. Анализ филогенетических взаимоотношений изолятов вируса клещевого энцефалита от таежных клещей, собранных в южных и центральных районах Республики Коми, выявил циркуляцию двух генетических вариантов ВКЭ, однако при этом не удалось обнаружить вариантов ВКЭ, относящихся к классическим штаммам европейского генотипа. Все исследованные изоляты не имели ближайших прототипов (геновариантов) среди известных штаммов сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ. Варианты Komi 10—01, Komi 10—04 и Komi 10—08 были нами классифицированы как геноварианты сибирского генотипа. Они относительно близки к прототипным штаммам Васильченко, Коларово, Заусаев сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита. Время дивергенции этих трех штаммов от общего предка оценивается приблизительно в 590 лет (Субботина, Локтев, 2012). К сожалению, применить методику молекулярных часов в отношении изолятов серии Komi не представляется возможным из-за небольшого размера определенной нуклеотидной последовательности. Однако филогенетическое дерево не позволяет предположить, что дивергенция северо-европейских и западносибирских изолятов произошла относительно недавно. Можно только высказать предположение, что история эволюции сибирского генотипа на севере Европы насчитывает не менее 590 лет. Принципиально важно отметить, что другие изоляты серии Komi группировались с дальневосточным генотипом ВКЭ. Данный факт для северо-востока нашей страны установлен впервые. Наиболее генетически близкие штаммы дальневосточного генотипа — это штаммы ВКЭ, изолированные около г. Хабаровска. Время дивергенции этих дальневосточных штаммов от общего предка оценивается приблизительно в 650 лет (Субботина, Локтев, 2012). По всей вероятности, изоляты Komi имеют сходное время эволюции в природных условиях северных районов европейской части России. Исключение составляет изолят Komi 10—16, который кластеризуется отдельно и, возможно, имеет более древнее происхождение. Однако сделать более точные расчеты и анализ мешает небольшой размер секвенированных фрагментов и их высокая вариабельность. Также вполне понятно, что относительно невысокие индексы поддержки узлов дивергенции филогенетического дерева позволяют говорить об эволюционных взаимоотношениях между этими изолятами с известной долей осторожности.

Эпидемиологическая значимость широкого распространения дальневосточного генотипа ВКЭ связана с более высокой патогенностью дальневосточного генотипа ВКЭ для человека. Так, для вариантов ВКЭ, циркулирующих в Приморском крае, летальность может достигать 30 и более процентов. Европейские и сибирские геноварианты ВКЭ вызывают более легкую форму заболевания с низким уровнем летальности (Gritsun et al., 2003b).

Анализ последовательности 5′-НТО в индивидуальных клещах, собранных в Республике Коми, показал, что этот район генома весьма вариабелен. Уровень вариабельности доходил до 100 %, особенно вариабельны были элементы A1, C1, B2, CSB, которые имели вариабельность более 50 %. При этом некоторые элементы 5′-НТО были полностью консервативны. Для уточнения возможного влияния наблюдаемых нуклеотидных замен на пространственную структуру 5′-НТО генома ВКЭ в клетках иксодовых клещей было проведено компьютерное моделирование вторичной структуры РНК этого района для вариантов Komi. Полученные результаты показывают, что наблюдаются существенные изменения пространственной структуры этого района генома в иксодовых клещах. Причем только изоляты Komi 01—01, Komi 10—13 и Komi 10—15 имели вторичную структуру этого района, характерную для адаптированных к клеткам млекопитающих вариантов сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ. Остальные 13 последовательностей имели изменения во вторичной структуре 5′-НТО. В целом наблюдаемая картина подтверждает предположение, что конформация 5′-НТО генома ВКЭ может иметь принципиальное значение для адаптации вируса к активной репликации в клетках различных видов.

Известно, что 5′-НТО район вирусной РНК формирует так называемую Y-структуру, которая является промотором для вирусной РНК зависимой РНК полимеразы, при этом особо значимыми для взаимодействия являются участки A1/A2 и петля в левом плече Y-структуры (между C1 и C2) (Filomatori et al., 2006). Элементы CS A и CS B вместе с соответствующими участками в 3′-НТО необходимы для циклизации генома и образования структуры «сковороды с ручкой». Мутации в элементах CS A и CS B могут блокировать репликацию, даже если они не теряют способности образовывать стабильные комплексы с 3′-НТО (Alvarez et al., 2008). Эти данные дают основания полагать, что 5′-НТО должна быть достаточно консервативной (Schrader et al., 1999). Однако при исследовании ВКЭ европейского генотипа у клещей *I. ricinus* в кантоне Берн (Швейцария) был отмечен высокий уровень вариабельности (до 55.5 %) в области 5′-НТО (Casati et al., 2006). В частности, участки CS A, CS B Y структуры и старт-кодон показали значительную гетерогенность. По мнению авторов, такая вариабельность связана с адаптацией ВКЭ к репликации в позвоночных и беспозвоночных хозяевах в природном очаге в Швейцарии. Этот очаг характеризуется высокой встречаемостью ВКЭ у клещей, но низкой заболеваемостью среди людей.

Интересно отметить, что модель вторичной структуры 5′-НТО для лабораторно адаптированных различных штаммов ВКЭ генотипоспецифична и весьма консервативна. Структура 5′-НТО для сибирского и европейского генотипов ВКЭ схожа, но она в сравнении с дальневосточным генотипом ВКЭ имеет существенные отличия. Вполне возможно, что это также взаимосвязано с более высокой патогенностью для человека дальневосточного генотипа ВКЭ. Сравнение последовательностей 5′-НТО ВКЭ в иксодовых клещах *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в г. Томске показало наличие множественных нуклеотндных замен в Y-структуре, участках CS A и CS B (Chausov et al., 2010). Старт-кодон изменениям не подвергался, хотя возможность этого была ранее показана (Casati et al., 2006).

Таким образом, полученные результаты подтверждают полученные ранее результаты по вариабельности 5′-НТО генома ВКЭ в иксодовых клещах. По всей вероятности, обнаруженные нуклеотидные замены обеспечивают изменение вторичной структуры РНК 5′-НТО генома ВКЭ. Это может иметь принципиальное значение для адаптации вируса в природных очагах к новым видам переносчиков и хозяев. Важно также отметить, что уточнение ареалов генотипов ВКЭ, изучение вариабельности вирусного генома и изучение биологических свойств также принципиально важно для улучшения диагностики, профилактики и лечения этого инфекционного заболевания в различных регионах России.

БЛАГОДАРНОСТИ

Проведенные исследования были проведены при частичной поддержке гранта президента Российской Федерации НШ-65387.2010.4 и НШ-2996. 2012.4; гранта РФФИ 12-04-00563-а; ФЦП «НС ХиББ РФ» ГК № 53-Д.

Список литературы

Глушкова Л. И., Корабельников И. В., Егорова Ю. И. 2011. Распространение клещей *Ixodes persulcatus* P. Sch. в южных и центральных районах Республики Коми. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. 3 : 48—50.

Глушкова Л. И., Корабельников И. В., Егорова Ю. И., Терновой В. А., Протопопова Е. В., Микрюкова Т. П., Кононова Ю. В., Коновалова С. Н., Тупота Н. Л., Карташов М. Ю., Чаусов Е. В., Локтев В. Б. 2012а. Возбудители инфекционных заболеваний в организме таежного клеща на территории Республики Коми. Дезинфекционное дело. 1 : 52—56.

Глушкова Л. П., Корабельников И. В., Терновой В. А., Протопопова Е. В., Микрюкова Т. П., Кононова Ю. В., Коновалова С. Н., Тупота Н. Л., Карташов М. Ю., Чаусов Е. В., Локтев В. Б., Егорова Ю. И. 2012б. Выявление возбудителей заболеваний в *Ixodes persulcatus* на территории Республики Коми. Сибирский медицинский журнал. Иркутск. 111 (4) : 88—91.

Зильбер Л. А. 1939. Весенний (весенне-летний) эпидемический КЭ. Советская медицина. 23 : 11—15.

Злобин В. П., Верхозина М. М., Демина Т. В., Джиоев Ю. П., Адельшин Р. В., Козлова И. В., Беликов С. П., Хаснатинов М. А., Данчинова Г. А., Исаева Е. П., Гришечкин А. Е. 2007. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Вопросы вирусологии. 52 (6) : 4—13.

Локтев В. Б., Терновой В. А., Нетесов С. В. 2007. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита. Вопросы вирусологии. 52 (5) : 10—16.

Локтев В. Б. 2011. Таксономия флавивирусов и их генетическое разнообразие. В кн.: В. В. Власова, В. Е. Репина (ред.). Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе. Новосибирск: Изд-во СО РАН. 257—279.

Субботина Е. Л., Локтев В. Б. 2012. Молекулярная эволюция вирусов клещевого энцефалита и Повассан. Молекулярная биология. 46 (1) : 82—92.

Alvarez D. E., Filomatori C. V., Gamarnik A. V. 2008. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5’ and 3’ UTRs. Virology. 375 (1) : 223—235.

Casati S., Gern L., Pifaretti J.-C. 2006. Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). Journal of general virology. 87 : 2235—2241.

Charrel R. N., Attoui H., Butenko A. M., Clegg J. C., Deubel V., Frolova T. V., Gould E. A., Gritsun T. S., Heinz F. X., Labuda M., Lashkevich V. A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D. V., Mandl C. W., Niedrig M., Papa A., Petrov V. S., Plyusnin A., Randolph S., Suss J., Zlobin V. I., de Lamballerie X. 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. Clinical microbiology and infection. 10 (12) : 1040—1055.

Chastel C., Main A. J., Guiguen C., le Lay G., Quillien M. C., Mannat J. Y., Beaucournu J. C. 1985. The isolation of Meaban virus, a new avivirus from the seabird tick *Ornithodoros* (*Alecorobius*) *maritimus* in France. Archives of virology. 83 : 129—140.

Chausov E. V., Ternovoi V. A., Protopopova E. V., Kononova J. V., Konovalova S. N., Pershikova N. L., Romanenko V. N., Ivanova N. V., Bolshakova N. P., Moskvitina N. S., Loktev V. B. 2010. Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5′ noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia. Vector borne zoonotic diseases. 10 (4) : 365—375.

Ecker M., Allison S. L., Meixner T., Heinz F. X. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. Jouirnal of general virology. 80 : 179—185.

Filomatori C. V., Lodeiro M. F., Alvarez D. E., Samsa M. M., Pietrasanta L., Gamarnik A. V. 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus synthesis on a circular genome. Genes and development. 20 : 2238—2249.

Gao G. F., Hussain M. H., Reid H. W., Gould E. A. 1993. Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. Virus research. 30 : 129—144.

Gould E. A., Zanotto P. M. A., Holmes E. C. 1997. The genetic evolution of the flaviviruses. In: J.-F. Saluzzo, B. Dodet (eds). Factors in the Emergence of Arboviruses Diseases, Paris, Elsevier. 51—63.

Grard G., Moureau G., Charrel R. N., Lemasson J. J., Gonzalez J. P., Gallian P., Gritsun T. S., Holmes E. C., Gould E. A., de Lamballerie X. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. Virology. 361 (1) : 80—92.

Gritsun T. S., Frolova T. V., Zhankov A. I., Armesto M., Turner S. L., Frolova M. P., Pogodina V. V., Lashkevich V. A., Gould E. A. 2003a. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. Journal of virology. 77 (1) : 25—36.

Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. 2003b. Tick-borne encephalitis. Antiviral Research. 57 : 129—146.

Khromykh A. A., Meka H., Guyatt K. J., Westaway E. G. 2001. Essential role of cyclisation sequences in flavivirus RNA replication. Journal of virology. 75 : 6719—6728.

Korenberg E. I., Kovalevskii Y. V. 1999. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 289 : 525—539.

Kovalev S. Y., Kokorev V. S., Belyaeva I. V. 2010. Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union. Journal of general virology. 91 (12) : 2941—2946.

Mandl C. W., Holzmann H., Kunz C., Heinz F. X. 1993. Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. Virology. 194 : 173—184.

Ogden N. H., Maarouf A., Barker I. K., Bigras-Poulin M., Lindsay L. R., Morshed M. G., O'Callaghan C. J., Ramay F., Waltner-Toews D., Charron D. F. 2006. Climate change and the potential for range expansion of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada. International journal of parasitology. 36 : 63—70.

Revich B., Tokarevich N., Parkinson A. J. 2012. Climate change and zoonotic infections in the Russian Arctic. International journal of circumpolar health. 71 : 1—8.

Schrader C., Suss J. 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 289 : 319—328.

Suzuki Y. 2007. Multiple transmissions of tick-borne encephalitis virus between Japan and Russia. Genes Genet. Syst. 82 (3) : 187—195.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution. 28 (10) : 2731—2739.

Tokarevich N. K., Tronin A. A., Blinova O. V., Buzinov R. V., Boltenkov V. P., Yurasova E. D., Nurse J. 2011. The impact of climate change on the expansion of *Ixodes persulcatus* habitat and the incidence of tick-borne encephalitis in the north of European Russia. Global health action. 4 : 8448.

Zanotto P. M., Gao G. F., Gritsun T., Marin M. S., Jiang W. R., Venugopal K., Reid H. W., Gould E. A. 1995. An arbovirus cline across the northern hemisphere. Virology. 210 : 152—159.

Zanotto P. M., Gould E. A., Gao G. F., Harvey P. H., Holmes E. C. 1996. Population dynamics of faviviruses revealed by molecular phylogenies. Proceedings of the national academy of sciences of USA. 93 : 548—553.

Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic acids research. 31 : 3406—3415.

GENETIC DIVERSITY OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN IXODES PERSULCATUS TICKS IN NORTHEASTERN EUROPEAN RUSSIA

T. P. Mikryukova, E. V. Chausov, S. N. Konovalova, J. V. Kononova,
E. V. Protopopova, M. Y. Kartashov, V. A. Ternovoi, L. I. Glushkova,
I. V. Korabel'nikov, J. I. Egorova, V. B. Loktev

Key words: Ixodid ticks, *Ixodes persulcatus*, tick-borne encephalitis virus, flavivirus, genetic diversity, phylogenetic analyses, nucleotide sequence, 5′-NCR.

SUMMARY

The genetic diversity of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in the PCR-positive Taiga ticks collected in the Republic of Komi in 2010 was evaluated. The analyses of nucleotide sequences of the 5′-NCR fragments of viral genome from ticks had shown that 13 isolates of TBEV from 16 sequencing variants were represented by the highly pathogenic Far Eastern genotype of the TBEV and only 3 isolates were identified as the Siberian genotype of TBEV. The nucleotide sequences of 5′-NCR of viral genome strongly varied variable in individual ticks. Variability for the A1 element has been observed in all the tested samples, and for elements CI, B2, CS B — in more than 50 %. A2 element and ATG codon of the 5′-NCR remained completely conservative. Computer simulation of conformations of the 5′-NCR of TBEV genome demonstrated the possibility of significant changes of the spatial structure of the 5′-NCR of viral genome in individual taiga ticks. The obtained data confirm the hypothesis that the variability in the 5′-NCR of TBEV genome can be crucial for efficient replication of TBEV in different hosts.